

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-504049

⑬ 公表 平成4年(1992)7月23日

⑭ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	部門 (区分) 1 (1)
C 12 Q 1/68	A	8114-4B	予備審査請求	有	
1/18		6807-4B			
// A 61 K 49/00	Z	8415-4C			

(全 7 頁)

⑮ 発明の名称 インビトロにおける組織の生存能力及び増殖能力を測定する、自生状態法及びシステム

⑯ 特 願 平2-500602

⑰ 翻訳文提出日 平3(1991)9月3日

⑱ 出 願 平2(1990)8月25日

⑲ 国際出願 PCT/US89/03719

⑳ 国際公開番号 WO90/11371

㉑ 国際公開日 平2(1990)10月4日

優先権主張 ㉒ 1989年3月20日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 326,286

㉕ 発 明 者 コナース ケニス エム アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92131 サン ディエゴ ア
ヴェニダ マグニフィカ 10365㉖ 出 願 人 アンティキヤンサー インコー. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92110 サン ディエゴ メ
ボレイテッド トロ ストリート 5325

㉗ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 7 名

㉘ 指 定 国 A T (広域特許), B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), F R (広域特許), G B (広域特許), I T
(広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 増殖能力及び生存能力に対する薬剤の腫瘍特異的効果を測定する方法であって、
 - (a) 腫瘍組織試料及び類似正常組織試料の第1の部分及び第2の部分を用いた容器で組織培養を行う工程、
 - (b) 該試料を薬剤にさらす工程、
 - (c) 該試料の第1の部分をDNA合成マーカーで処理し、かつ該試料の第2の部分をタンパク質合成マーカーで処理する工程、
 - (d) 前記処理を行った試料の部分を、所定の時間、培養する工程、及び
 - (e) 第1の部分及び第2の部分それぞれのDNA合成マーカー及びタンパク質合成マーカー取り込み量を測定し、それにより細胞増殖能力及び生存能力に対する前記薬剤の腫瘍特異的効果を測定する工程を含む方法。
2. DNA合成マーカーが、³H-チミジンであり、タンパク質合成マーカーが³⁵S-チミジンである請求の範囲第1項記載の方法。
3. 工程(d)における所定の時間が、2〜約5日間である請求の範囲第1項記載の方法。
4. 工程(b)を行う前に、各試料の第1の部分及び第2の部分を、2〜約6日間培養する請求の範囲第1項記載の方法。
5. 腫瘍の侵襲性を測定する方法であって、
 - (a) 腫瘍細胞の試料を培養する工程、
 - (b) 該試料をDNA合成マーカーで処理する工程、
 - (c) 処理した試料を所定の時間、培養する工程、及び
 - (d) DNA合成マーカーを取り込んだ腫瘍細胞の割合(%)を測定し、それにより腫瘍の侵襲性を測定する工程を含む方法。
6. DNA合成マーカーが、³H-デオキシチミジンである請求の

範囲第5項記載の方法。

7. タンパク質合成マーカー及びDNA合成マーカーを含む、細胞の生存能力及び増殖能力のインビトロ測定用キット。
8. タンパク質合成マーカーが³⁵S-メチオニンであり、DNA合成マーカーが³H-デオキシチミジンである請求の範囲第7項記載のキット。
9. さらに腫瘍細胞毒性薬剤を含む請求の範囲第7項記載のキット。

発明の概要

明 細 書

インビトロ(in vitro)における組織の生存能力及び増殖能力を測定する、自生状態法及びシステム

発明の属する分野

本発明は、インビトロ培養システムを使用して、人組織、特に腫瘍組織の細胞の増殖能力及び細胞の生存能力を測定する方法、及び培養された細胞の増殖能力及び生存能力に対する抗腫瘍薬剤の効力を測定する方法に関するものである。

発明の背景

癌は不適切な細胞部位を伴う病気である。癌における変性増殖の生態を正常な組織と比較して理解するため、及び癌の予測及び治療の基礎となる増殖能力に関する情報に用いるために、現実的なモデルが非常に必要とされている。

現在、チミジンラベル指数(TLI)、S相にあると推定される細胞の流動血球計算測定法、又は少なくともある種の増殖細胞タイプに見出される核抗原Ki-67を測定することによって、腫瘍の増殖能力を測定している(Meyerらの論文、Breast Cancer Res. Treat., 4:79-88 (1984); McDivittらの論文、Cancer, 57:269-76 (1986);及びMcGurrinらの論文、Cancer, 59:1744-50 (1987))。いずれの方法を使用しても、得られる結果は、S相画分が高くなるほど、低い予測性を示す。TLI法を利用した臨床的研究では、再発率48%の胸部癌に罹っているリンパ節陰性の婦人の小集団の確認及び治療法の決定に成功している(Meyerらの論文、51:1879-89 (1983))。したがって、そのような方法には、癌の予測、治療及び腫瘍の増殖能力を測定する場合の生態に関し、大きな潜在的な価値がある。

しかしながら、同じように重要なのは、TLIの測定は、現在の

細胞が混入するため、流動血球計算法による測定では過少評価されるようである。原発性胸部カルシチンマから得た、インビトロでの2倍体細胞の優越能力が、明瞭に示されている(Smithらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1805-9 (1985))。

核抗原Ki-67は、胸部癌細胞が増殖する時に現れるようであるが(McGurrinらの論文、Cancer, 59:1744-50 (1987))、他の組織タイプに対するその関連性は、まだ知られていない。

最も重要と思われるのは、これらの技術が、ある時点で(流動血球計算法、Ki-67)、又はごく短いラベル時間(TLI)の後、S相の細胞を測定することである。したがって、これらの測定方法は、腫瘍の増殖能力のさらに正確な測定を十分に反映することができる、腫瘍の総細胞生育画分の評価を妨げるものである。

重要なのは、前記のいずれの方法も、正常な組織、特に、腫瘍組織の近くにあるものと比較して、増殖能力を系統的に測定するのに応用できないことであり、さらに前記方法は、抗増殖治療剤の存在下で、腫瘍増殖の比較測定に系統的に応用できないことである。

発明の要約

本発明は、患者の生検材料から得られた細胞の細胞増殖能力及び/又は細胞生存能力を測定する、改良インビトロ分析システムを提供する。本発明により行われる細胞増殖能力及び生存能力に関する測定は、腫瘍の程度、段階及び総合的な優越性を正確に予測する。

また、本発明は細胞増殖能力及び/又は生存能力に対する薬剤の腫瘍特異的効果を測定する方法も意図する。この方法は、腫瘍組織試料及び正常組織試料の各々を第1の部分及び第2の部分として別々の容器で組織培養することを含むものである。正常組織

TLIの測定法では非実用的、かつ生理学的でないことである。胸部腫瘍の分析は、手術のほぼ2時間以内に行わなければならない、そのことが中央研究所でこの測定を行うことを妨げている。一般に、TLIを、塩溶液中で、非常に高い気圧下で測定し、組織中に³H-チミジンが浸透することを可能にする。これらの条件下では、腫瘍は2~3時間後には生存能力の失い、かつ多くの場合、周期化できる細胞は測定できないと考えなければならない。その理由は、測定の時間が腫瘍内の非同時性細胞の世代時間よりも大幅に短いからである。他の人腫瘍タイプについては、外科的に得られた標本の増殖可能性についての測定に関する情報はほとんどない。

一方、流動血球計算法は、細胞周期動態の迅速な測定法を提供し、かつ細胞の異数性も評価することを可能にするが、次の技術上の問題を有する。(i)機械的又は酵素的に解離して、単一細胞の懸濁液にすることが要求され、この結果、組織構造に見出される能力の損失、及び細胞の1種以上の特定の母集団の潜在的な選択的損失が生じる。空間的な組織構造を含む、個々の腫瘍の全ての異種細胞タイプを完全に評価することは、予測試験法を開発する上で明らかに重要である。(ii)流動血球計算法は、S相2倍体細胞、及び異数性休止又は生存不能細胞を明瞭に区別できない。このことは重要な問題である。その理由は、研究によると、異数性細胞に富む腫瘍細胞の部分母集団は、色素排除分析(dye-exclusion analysis)を行うと大部分が生存不能であることが示されているからである(Frankfurtらの論文、Cytometry, 5:71-80 (1984); Slocumらの論文、Cancer Res., 41:1428-34 (1981);及びLjungらの論文、Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 28:34 (1987))。(iii)さらに、2倍体腫瘍のS相画分は、非増殖性、非腫瘍性の

試料は、腫瘍の幹細胞に類似する組織からのものである。組織培養した試料を、1種以上の濃度の、その効果を評価しようとする薬剤にさらす。次に、この薬剤にさらした試料を増殖マーカー(DNA合成マーカー)で処理し(接触させ)、所定の時間、培養(組織培養)する。次いで、マーカーを取り込んだ細胞の割合(%)を測定し、類似正常細胞と腫瘍細胞から得られた結果を比較することにより、細胞の生存能力及び/又は増殖能力に対する薬剤の腫瘍特異的効果を測定する。

発明の詳細な説明

本発明は、自生環境、すなわち組織の部分における細胞の生存能力及び/又は増殖能力に対する薬剤の効果を測定する方法を提供する。このような薬剤「感受性の測定を行う場合、腫瘍の細胞を、1種以上の所定投与水準の1種以上の所定の薬剤にさらして、その効果を、複数の容器を使用し、同じ外植組織の均一標本を個々に培養することにより測定する。均一標本の一つをコントロールとして使用し、薬剤にさらすことなく、細胞の生存能力及び増殖能力を定量的に測定する。それぞれの他の均一標本を、異なる投与水準で薬剤にさらし、次に、それぞれタンパク質合成マーカー及び/又はDNA合成マーカーを使用して、生存能力及び増殖能力を定量的に測定する。すなわち、各組織試料中の生存する細胞の数を、細胞タンパク質にタンパク質合成マーカーを代謝的に取り込んだ細胞の数により示す。同様に、増殖した細胞の数を、細胞DNAにDNA合成マーカーを代謝的に取り込んだ細胞の数によって示す。

細胞タンパク質合成の代謝的マーカーは、当該技術分野において周知であり、例えば、³⁵S-メチオニン、¹⁴C-アラニン、¹⁴C-グリシン、¹⁴C-グルタミン酸、¹⁴C-プロリン、³H-ロイシン、³H-

セリン等の放射性元素でラベルしたアミノ酸を用いる。

細胞DNA合成の代謝的マーカーも、当該技術分野において周知であり、例えば、 ^3H -デオキシチミジン、 ^3H -デオキシアデニン、 ^3H -デオキシグアニン、 ^3H -デオキシシトシン等の放射性元素でラベルしたヌクレオチドがある。

本発明を適用することができる様々なタイプの組織には、正常細胞、並びに原発性又は転移性腫瘍があり、その中には固形腫瘍（カルチノーマ及びサルコーマの双方）等が含まれる。本発明の分析方法を適用することができる、各種タイプのカルチノーマ（腺癌、鱗状及び各部位のカルチノーマのうち未分化変異体）には、次のものが含まれる；例えば、副腎、膀胱、胸部、結腸、腎臓、肺、卵巣、脾臓、前立腺、甲状腺、上部気道（頭部及び首）、子宮（本体及び頸部）、胆管、絨毛癌、食道、肝臓、上皮小体、直腸、唾液腺、小腸、胃、睾丸、舌及び尿道である。本発明を適用することができる各種タイプのサルコーマ及び他の腫瘍には、例えば、広汎性のリンパ腫、ユーイング腫瘍、ホジキン病(Hodgkin's disease)、黒色腫（黒色及びメラニン欠乏）、多発性骨髄腫、腎芽細胞腫(Wilm's tumor)、神経芽腫、小結節リンパ腫、横紋筋肉腫、血管肉腫、脂肉腫（神経膠腫）、軟骨腫、未分化胚細胞腫、纖維肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、骨芽細胞腫、中皮腫、骨肉腫、網膜芽腫及び胸腺腫がある。

一般に、その細胞の生存及び／又は増殖特性を測定しようとする組織を、敗血性の外科的処置によって外植し、かつその部分を約0.5～約1.0 cm²、好ましくは約1.0～約8.0 cm²、さらに好ましくは1.0～2.0 cm²の容量の切片に分割する。

腫瘍を分析する場合、分離した分析により、腫瘍の多くの部分を試験することが重要である。その理由は、腫瘍が非常に不均一

なことが好ましい。

本明細書中の“薬剤にさらす投与水準”とは、薬剤濃度を量的に調整したもの（例えば、 μM ）及びさらす時間（例えば、時間又は分）をいう。通常、薬剤濃度及びさらす時間は、インビトロで達成される薬剤にさらす投与水準を、インビトロで模擬的におこなえるようにした薬理学的なデータから計算する。本発明の分析方法により薬剤の感受性測定をおこなう場合に、要求される薬剤にさらす投与水準は、本発明のシステムで試験する公知の抗癌剤に関し、臨床的に達成される薬剤にさらす投与水準の最大5%～10%であることが見出された。

前記の薬剤感受性測定は、外植細胞から得た特定の人腫瘍に対する所定の薬剤の抗癌活性を示す“薬剤感受性指数”を、所定の薬剤について測定を可能にする方法でおこなうことができる。この方法には、多くの対数範囲におよぶ複数の投与水準の薬剤感受性の測定をおこなうこと、及び、次いで、これらの測定の結果を使用して、生存率(%)（薬剤にさらしたものとから得られた分析値対薬剤にさらしていないコントロールの分析値の%)対薬剤にさらす投与水準を曲線にプロットすることが含まれる。次いで、所定の薬剤の“薬剤感受性指数”を、その薬剤で臨床的に達成できる最高の、薬剤にさらす投与水準と相関する規定の上限まで、曲線の下部面積を測定することにより定量する。

前記の方法で得られた感受性指数は、外植細胞から得られた特定の人腫瘍に対する薬剤の抗癌活性を高度に表示するものであり、低い感受性指数でも高い抗癌活性を示す。

試験する薬剤の存在下で細胞を組織培養した後（約1～4日間）、試料を増殖能力マーカー及び生存能力マーカーの存在下で処理する。

だからである。

立方形にした後、外植組織を均一標本となるよう、通常少なくとも約6個に分割する。通常、そのうちの1個は、試験しようとする薬剤にさらさず又は接触させずコントロールとする。次いで、組織の三次元的完全性を維持するように、均一標本を含水細胞外マトリックス含有ゲル上で組織培養する。

組織培養に適した、組織培養できる品質水準の細胞外マトリックス含有ゲルは、当該技術分野において周知であり、Yannasらの米国特許第4,060,081号に記載されており、商品名 Gelfoam (Upjohn社) から販売されている。

組織細胞の生育を維持できる各種の液体組織培養用栄養培地は、当該技術分野で公知である。使用することができる培地は、インシュリン、トランスフェリン、セレン、エストラジオール等の添加剤を含む、血清を含有する又は血清を含有しないものである。本発明に特に適していることが見出された培地は、イーグル最小必須培地(Eagle's minimal essential medium(HEM)) [Eagle, *Science*, 122:501(1955) and Eagle, *Science*, 130:432(1959)]。

通常、細胞を試験する薬剤にさらす前に、その組織を少なくとも2～5日間、好ましくは約3～4日間、組織培養する。通常、この培養は、加湿された雰囲気下で、組織試料を採取した動物の体温に対応する温度、例えば、人組織試料では37℃でおこなう。

生存能力及び／又は増殖能力を測定することを目的とする細胞を薬剤にさらす処理は、組織試料をタンパク質合成マーカー及び／又はDNA合成マーカーで処理する前におこなう。この処理は、組織試料を所定量の薬剤（所定濃度）を用いて、前もって定めた時間（所定時間）、培養すること、及びその後、組織試料を薬剤と分離し、好ましくは残留薬剤が試料組織からなくなるように洗

滌する。組織試料の細胞を、薬剤にさらし、増殖能力マーカー及び生存能力マーカーによって処理し、かつ続いて、組織培養した後、通常、この試料をホルマリンのような組織固定剤中で固定し、パラフィン等の中に埋め込み、マイクロチン(microtome)上で切片にする。生存能力マーカー及び／又は増殖能力マーカーが放射能活性ラベルを含む場合、続いて、切片をNTB (Kodak社)核痕跡乳剤(nuclear-track emulsion)で処理し、現像する。

次いで、この切片を分析し、生存能力マーカー又は増殖能力マーカーの存在が、陽性である細胞の割合(%)を求める。放射能活性ラベル及び核痕跡乳剤を使用した場合、この分析を、偏向顕微鏡でおこなうことができる。ここで好ましい望遠鏡は、分析した像をデジタル化することが可能なコンピューターに連動したビデオカメラを通して処理することにより、拡大像をデジタル化することである。

ここまで述べてきたことから明らかなように、本発明のインビトロ分析システムは、癌の化学療法に対する臨床的応答のインビトロでの予測、並びに臨床試験における新しい抗癌剤のスクリーニングに利用することができる。例えば、特定の癌に罹っている特定の患者を治療する場合、この特定の癌の生検材料から得た外植細胞を、本発明の技術に従って、分析することができ、特定の癌の化学療法に潜在的に臨床的有効性を有する複数の異なる抗癌剤について、薬剤感受性を測定することができる。試験する各種薬剤の相対的な薬剤感受性指数を測定した後、これらの感受性指数を、化学療法に使用する上で最も有望な効果的薬剤の予測的な選択に使用することができる。既往及び予測の双方における、この技術の予測的な臨床試験において、インビトロの予測及びインビボの応答の間に見出される相関関係は印象的なほど高く、10

0%に達する。

他の態様として、本発明は、腫瘍の“生育因子指数”を測定する方法を意図する。腫瘍の生育因子指数は、腫瘍のインビボでの程度と段階に関係、すなわち、腫瘍、特に胸部及び卵巣のカルチノーマのインビボの侵襲性に関係する。

生育因子指数は、前記のように腫瘍細胞の試料を組織培養することにより測定する。続いて、この細胞を、前記のDNA合成マーカーの1種である、例えば、³H-デオキシチミジンのような増殖マーカーで処理する。この処理した細胞を所定の時間、培養し、次いで、増殖マーカーを取り込んだ細胞DNAを有する試料細胞の割合(%)を測定する。この割合(%)は、その腫瘍に固有の生育因子指数を示す。

他の態様として、本発明は、前記の細胞生存能力及び/又は増殖能力のインビトロ測定用キットを意図する。このキットに含まれるのは、少なくとも1回の分析を行うのに十分な量の、生存能力及び/又は増殖能力に関し、その効果を試験する試薬、生存及び/又は増殖マーカー、及び分析をおこなう容器である。

実施例

次の実施例は、本発明の説明のみを目的とするものであって、他に特定しない限り本発明を制限することを意図するものではない。

1. 細胞の増殖能力

各種の正常組織及び腫瘍組織の標本を、下記カッコ内の論文に記載されたように、人間の患者から移植した(Freemanらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2694-98(1986)、Vescioらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5029-33(1987))。なお、本明細書中に引用するすべての文献の記載事項は、本明細書

に複製写真機を使用した。複製細胞は、付帯照明偏光システムないで明るい緑色に見える銀の粒子が細胞核一面に存在することにより確認できた。この銀の粒子は、放射性DNAに対するNTB-2乳濁液の感光により生じたものである。前記の方法で、腫瘍移植組織における細胞の細胞増殖能力を示す、組織学的な放射能写真を得ることができる。

自生状態システムで培養した大部分の腫瘍は、少なくとも若干の領域で高い細胞増殖能力を示し、かつ増殖能力に関し、腫瘍間では不均一であった。試験した腫瘍は、結腸、卵巣、膀胱、腎臓、脳、及び耳下腺の腫瘍、及び小細胞肺カルチノーマ及びユーイングサルコーマであった。すべての場合、本来の組織に対応する三次元組織模倣を、培養期間をとおして維持した。付帯照明偏光顕微鏡により、放射能ラベル増殖細胞の検出を高水準でおこなうことができる。この顕微鏡は、入射する偏光の散乱により、放射能写真感光銀粒子の検出量を高める。

転移結腸・直腸腫瘍の増殖能力は、培養体で高度なラベル作用を示した。観察した培養調製物の細胞の90%以上は、肝臓に対するこの相対的な未分化結腸転移のラベル期間中に増殖した。小細胞肺腫瘍の増殖能力は、エンバク細胞タイプ(oat cell type)の2種の主なクラスを維持することを示した。この典型的な小細胞及びさらに伸長した紡錘状細胞タイプは、それぞれ高い細胞増殖の水準を有していた。

卵巣カルチノーマにおける増殖能力は、上皮細胞での増殖の非常に高い指数を一貫して示し、一方、ストロマ細胞は無活動のままであった。この組織学的な放射能写真は、生育を維持するゲルマトリックスに侵襲した卵巣カルチノーマ細胞の高い増殖能力を示していた。この侵襲作用は、インビボで卵巣腫瘍が腹膜を頻繁

の内容として引用する。簡明すると、組織を外科的に取り出した後、それを直径1~2mmの切片とし、豚の皮膚(Gelfoam, Upjohn)から調製した前記含水細胞外マトリックス含有可換性ゲルの上に置き、三次元培養体を構成する。イーグルの塩類、グルタミン、牛胎児血清10%、非必須アミノ酸及び抗生物質ガラマイシン及びクラホランを含むイーグル最小必須培地(MEM)を、前記培養体に、ゲルの上部を覆わないように加え、その培養体を二酸化炭素培養器中で、37℃に維持し、移植組織標本が生育できるようにした。

培養をおこなって10~12日後、増殖可能な三次元培養体ないの細胞を、³H-チミジンと³H-デオキシウリジン(それぞれ2μCi; 1Ci = 37GBq)を組み合わせて投与することにより、4日間かけてラベルした(Vescioらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5029-33(1987))。細胞DNAは、組織内で複製する細胞内にある場合にラベルされる。4日間ラベルした後、培養体をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、組織構造カプセルに入れ、10%ホルマリンで固定した。次いで、この培養体を、脱水し、パラフィンに埋め込み、標準的な方法で切片にし、その切片を顕微鏡ガラスの上に置いた。

次いで、載物ガラス上の切片からパラフィンを除き、暗所でコダックNTB-2乳濁液により被覆し、放射能写真技術用に調整し、5日間かけて感光した後、現像した。現像し、すすいだ後、切片をヘマトキシリン及びエオシンを用いて染色した。

次いで、各種の組織培養においてDNA合成をおこなった細胞の割合(%)を測定することにより、切片を分析した。この測定には、付帯照明偏光照射システム(epi-illumination polarization lighting system)を装着したニコン又はオリンパスの偏光顕

に侵襲する態様によく似ている。

脾臓、膀胱、腎臓、脳、及び耳下腺の腫瘍、及びユーイングサルコーマを含む様々な腫瘍における増殖能力は、多くのこれら培養された腫瘍における増殖細胞を含む入り組んだ線構造を示した。

増殖する悪性細胞タイプと正常細胞タイプ、例えば、胸部腫瘍上皮細胞と正常なストロマ細胞とを、調製した放射能写真で観察し、区別できることが重要である。

これらの研究においてさらに重要な注目すべき事項は、正常組織を培養し、かつ十分に増殖させることである。患者第431号の胸部から得た移植腫瘍組織及びその近くの正常組織を比較した。大量の細胞増殖が、正常組織に存在することが見出された。しかし、さらに高い水準の組織構造が、正常組織において維持されていることが観察された。このシステムを使用することにより、腫瘍と正常な生態、例えば、栄養要求性、生育因子要求性及び代謝経路を比較することが、現在、可能である。また、特に重要なのは、潜在的な腫瘍薬剤の抗腫瘍感受性を、その薬剤に対する腫瘍と正常組織の応答を比較することにより測定することが、現在、可能である。この場合、実施例3に記載するように、終点として細胞増殖を利用する。

これらの結果は、本発明が、比較的長期の培養において、すべての主要なタイプの人腫瘍の増殖能力の測定に用いる一般的なシステムであることを示している。前記のとおり、この報告におけるすべての培養を、インビトロで、比較的長い期間である14日間おこなった。ほとんどの腫瘍標本で、培養期間をさらに長くできる(データは示していない)。外科的に得た標本の90%以上は、このシステムを用いて培養し、かつ増殖能力を分析することができる。

偏光顕微鏡を補助手段として用いる、生状態培養システムは、潜在的に増殖能力がある細胞を検出できる確立が高い。

増殖細胞の画像分析をおこなうために、ビデオカメラを顕微鏡に装着した。次に、胸部カルチノーマ組織を使用して前記の方法で撮影した放射能写真を、照明光(Bright-field light)を使用せず、偏光のもとで調べた。これにより、核痕跡乳濁液の銀粒子を感光した放射能活性がある細胞のみを視覚化した。この放射能活性がある細胞は、偏光を明るく反射した。得られた像を、最初にデジタルボードによりデジタル化する、コンピューターが補助する画像分析装置により分析し、続いて、ラベルされ、すなわち明るい細胞の数に対応する明領域を増強された画素の領域として、P-See プログラムのFas-com バージョン(The Microworks, Del Mar, CA)をIBM PC XT 互換性コンピューターで作動することにより計算した。増強された画素の領域は、ラベルされた細胞の数と比例する。

この画像分析システムを使用して、放射能写真を、ラベルされた増殖細胞の数に関し、自動的に分析した。照明光・偏光顕微鏡を使用することにより、培養胸部腫瘍のラベルされた細胞が明るい緑色で現れた。この測定には、照明光を用いず、偏光を用いる付帯照明偏光顕微鏡を使用することにより、ラベルされた細胞のみ視覚化した。次いで、ラベルされた細胞の像をビデオカメラとP-Seeプログラムを介してデジタル化した。続いて、明領域、すなわち増強された画素の領域をFas-Comプログラムにより自動的に測定した。増強された画素の領域は、ラベルされた細胞の数と比例するので、ラベルされた増殖細胞の自動的な計数が可能になる。

この培養システムで重要な点は、腫瘍をその上に外植した可換

理をおこなった。次に、調製した培養体を、実施例1に記載したデジタル化処理後、分析用コンピュータープログラムFas-comを使用して分析した。培養細胞に取り込まれた³⁵S-メチオニンを測定することが、細胞のタンパク質合成の測定を可能にする。したがって、これにより細胞の生存能力を測定する。培養細胞への³H-チミジン取り込みの測定が、DNA合成の測定を可能にする。したがって、これにより細胞の増殖能力を測定する。

³⁵S-メチオニン又は³H-チミジンの存在下で培養した組織標本は、生存し、又は増殖する細胞を個々に又は双方とも含む組織部分であり、放射性ラベルを取り込んだ。生存力の無い又は増殖しない細胞は、これらそれぞれのラベルを取り込まず、調製した標本の視覚的な検査において銀粒子は存在せず、また増殖細胞にも存在しない。なお、付帯照明偏光システムで分析する場合、この銀粒子は明るい緑色の目印となるものである。

インビトロ生状態培養システムで測定できる増殖能力の範囲は、腫瘍の程度及び段階に関連する。腫瘍が悪性になるほど、インビトロで測定される増殖能力は高くなる。増殖能力の範囲は、顕微鏡で観察できる選択された視野に存在する、細胞総数の母集団における増殖細胞の割合(%)として測定する、生育因子指数(GFI)として表すことができる。したがって、測定したGFIを使用して、試験する人癌組織の臨床的進行段階を予測することができる。Fas-com プログラム分析は、半自動的に腫瘍の増殖能力又は生存能力を測定する定量的手段を提供し、これはGFI データを提供するには、理想的で、適当な手段である。

増殖能力分析を、転移又は原発性で、また不十分に又は適度に分化した多くの外植胸部腫瘍組織についておこない、試験した腫瘍の各タイプについて平均GFIを得た。転移腫瘍は、GFIが平均

性細胞外マトリックス含有ゲルを使用することである。他の研究者は、可換性細胞外マトリックス含有培養基が、分化した細胞の生育及び機能化に不安定であると述べている(Liらの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:136-40(1987); Davisらの論文、Science, 236:1106-9(1977); Schaeferらの論文、Cancer Res., 43:279-86(1983); Schaeferらの論文、Differentiation, 25:185-92(1983); 及びLeighton J. の論文、Tissue Culture Methods and Applications, eds., Kruseらの論文、(Academic, New York), pp. 367-71(1973))。

ここに述べた一般的な原理は、すべてのタイプの人組織に適用することができ、潜在的で重要な生物学的及び臨床的な予測情報の蓄積を可能にする。さらに、これらの多くの腫瘍は、高度の細胞増殖能力を有していることに注意しなければならない。このような増殖能力の統制解除を許容することについての最終的な理解を、前記システムを使用して促進しなければならず、そのことが我々に腫瘍形成が起こる変化の、より深い理解を可能にする。

2. 生状態組織培養における細胞生存能力及び増殖能力の測定

胸部カルチノーマに罹った患者から取った腫瘍の組織標本を、実施例1に記載したように調製し、直径1mmの切片に分割し、それぞれ可換性ゲルマトリックス上に置き、三次元培養体を形成した。同一の培養体を、それぞれの標本について調製し、³⁵S-メチオニン又は³H-チミジンのいずれかを8マイクロキュリー(μCi)づつ加えた。各培養は、放射性ラベルを含む培地2mlを含むものであった。ラベルした培養体を、前もって4日間、維持し、連続的にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)ですすいで、過剰な放射性ラベルを各培養した標本から洗い出し、かつこの培養体に、実施例1に記載した組織学的処理及び放射能写真技術による視覚化処

して 0.437 ± 0.149 であったのに対し、原発性腫瘍は、GFI 0.282 ± 0.138 の低い平均値を示した。同様に、分化が不十分な腫瘍は、GFIが平均して 0.372 ± 0.150 であったのに対し、分化が適当な腫瘍は、GFIが平均して 0.220 ± 0.094 であった。この結果は、GFIが腫瘍の激しき及び臨床的予測と相關することを示している。

3. インビトロにおける組織の生存能力及び増殖能力を測定する生状態システムを使用した薬剤応答性の測定

組織標本培養体を、実施例2に記載したように、各種の腫瘍組織を用いて調製した。4日間、培養した後、各組織の多数の培養体を、所定の温度の後述する薬剤の存在下で、さらに24時間、培養した。

次いで、培養体を培地中で洗浄して過剰の薬剤を除き、薬剤が存在しない状態で3日間、培養して、細胞を一時的な薬剤の効果から回復させ、次いで、実施例2に記載したようにラベルした。ラベルした後、その培養体を、実施例1で記載したように処理し、薬剤の存在下で培養した場合の、標本の生存能力の程度及び増殖能力の程度を視覚化した。

卵巣カルチノーマに罹った患者の卵巣カルチノーマ組織から取って培養した細胞について、下記薬剤の存在下で、前記の方法により、細胞増殖能力について試験をおこなった。使用した薬剤は、シスプラチン($1.5 \mu\text{g/ml}$)、5-フルオロウラシル($4 \mu\text{g/ml}$)、メルファラン($10 \mu\text{g/ml}$)、メトトレキサート($22.5 \mu\text{g/ml}$)、又はチオテパ($60 \mu\text{g/ml}$)である。その結果、³H-チミジン及び³⁵S-メチオニン双方の取り込みによって発生する検知可能なシグナルは減少した。このことは、増殖能力及び生存能力の双方が阻害されたことを示している。細胞増殖能力の低下は、

同じ標本を薬剤が無い状態で培養し、GFI を測定した場合に、GFI の低下として表われる。細胞増殖能力は低下して、シスプラチンを使用すると90%に、5-フルオロウラシルを使用すると99%に、メルファランを使用すると70%に、メトトレキサートを使用すると70%に、チオテパを使用すると90%になった。卵巣カルチノーマに罹った患者 S.D. から得た外植腫瘍組織は、メルファラン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、細胞増殖能力が70%以上に阻害された。この腫瘍は、メルファランを使用した治療に反応し、治療中に腫瘍サイズの減少を示した。したがって、薬剤に対する腫瘍のインビロ応答性とインビトロ自生状態の薬剤応答性との間には臨床的な相関性があることが明らかなった。

胸部カルチノーマに罹った患者の組織から取り培養した細胞に対し、薬剤の存在下で前記のように試験をおこなった。この結果、細胞の増殖能力は、次のカッコ内に示した割合に低下した：アドリアマイシン290 ng/ml (90%)、5-フルオロウラシル4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (90%)、メルファラン1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (80%)、メトトレキサート2.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (70%) 又はビンクレステン23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (70%) である。

患者 D.H. を、胸部カルチノーマと診断し、かつ、5-フルオロウラシル又はアドリアマイシンのいずれかを使用した、インビロ治療に反応しないと判断した。5-フルオロウラシル又はアドリアマイシンのいずれかの存在下で前記のようにおこなった培養は、患者 D.H. の胸部カルチノーマ組織の細胞増殖能力を、十分に (すなわち、90%より多く) 阻止しなかった。したがって、インビロ応答性とインビトロ細胞増殖能力の低下との間に臨床的な相関性があった。

結腸・直腸癌に罹った患者から取った癌性腫瘍を培養した細胞

を、各種の前記薬剤の存在下で前記のように試験をおこなった。その結果、細胞の増殖能力は、次のカッコ内に示した割合に低下した：5-フルオロウラシル4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (90%)、マイトマイシンC1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (90%) 及びBCNU2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (90%) である。患者 V.S. を、結腸・直腸癌と診断し、かつ、5-フルオロウラシルを使用した、インビロ治療に反応しないと判断した。5-フルオロウラシルの存在下で前記のようにおこなった外植組織の培養は、患者 V.S. の結腸カルチノーマ細胞の細胞増殖能力を、十分に (すなわち、90%より多く) 阻止しなかった。再度、インビロ応答性とインビトロ応答性との間に臨床的な相関性が観察された。

以上の結果は、活性薬剤が細胞増殖能力を阻止する場合、細胞増殖能力を、腫瘍の薬剤応答性の測定に使用することができることを示している。細胞が増殖状態にない場合、 ^{35}S -メチオニン取り込みによって測定する腫瘍組織の生存能力を利用して、腫瘍の薬剤応答性を示すことができる。また、生存能力の範囲は、最大応答に関する終点を測定するのに利用することができる。

これまでの説明及び実施例は、本発明を説明することを意図するものであって、その範囲を制限するものではない。この発明の精神及び広がり範囲内にある他の変形例を、さらに具体化することが可能であり、当業者であればそれを容易に実施することができる。

国際調査報告

International Application No. PC1/US89/03719

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's Classification, IPC Class, and U.S. Class.)	
IPC(5): C12Q 1/68 U.S. Cl.: 435/6	
2. FIELDS SEARCHED (Minimum Documentation Search)	
Classification System	Classification System
U.S.	435/6, 68, 91, 240, 23, 830 436/63, 64, 86, 100, 813, 815 935/11, 16, 36, 77, 86
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Category of Document
Y	Cancer Research, Volume 42, published in 1982, F. R. Althaus et al., "Chemical Quantitation of Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Hepatocytes as an Assay for the Rapid Screening of Potential Chemical Carcinogens," pages 3010-3015, see especially the Introduction on page 3010.
X	Journal of Toxicology and Environmental Health, Volume 10, published in 1985, C.H. van Aswegen et al., "Influence of Phomopsin and Ivalin on Steroid Hormone Binding and Growth of MCF-7 Human Breast Cancer Cells," pages 13-23, see especially the Abstract on page 13.
X,P	Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), Volume 80, published in 1983, March, R.M. Hoffman et al., "A General Native-state Method for Determination of Proliferation Capacity of Human Normal and Tumor Tissues in Vitro," pages 2013-2017, see especially the Abstract on page 2013.
4. ESTIMATION (Date of the Actual Commission of the International Search Report)	
09 FEBRUARY 1990 (09.02.90)	
Date of Filing of the International Search Report	
23 FEB 1990	
International Searching Authority	
ISA/US	
Signature of International Searching Authority	
Arden Marschel	

10. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category	Category of Document
X	Folia biologica (Praha), Volume 28, published in 1982, R. Stetina, et al., "Effect of Aflatoxin B ₁ on Growth of Normal and Malignant Rat Fibroblasts in Tissue Culture," pages 193-210, see especially the Results section, bridging paragraph on pages 199-200, and the section on ^3H -thymidine incorporation on pages 195-196, bridging paragraph.
Y	Experimental Cell Research, Volume 88, published in 1974, J.E. Trosko, et al., "A Sensitive Method to Measure Physical and Chemical Carcinogen-induced 'Unscheduled DNA Synthesis' in Rapidly Dividing Eukaryotic Cells," pages 47-53, see especially the Materials and Methods section (Tissue Culture and experimental culture procedures) on page 48.
Y	The Journal of Histotechnology, Volume 9, Number 1, published in 1986, A. Richters, "Advantages of Combining Histopathology, Tissue Culture, and Ultrastructure in Studying Disease Processes," pages 21-22, see especially the Introduction on page 21.
A	US, A, 4,711,856 (SPELSBERG) 08 DECEMBER 1987 (08.12.87), see especially Figure 1.

第1頁の続き

⑦発明者

メーソン モンソフ アンゼ
ット

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ120
ゲネシー アヴェニュー 8148